自動化されたサンプル前処理によるデータ品質の向上

アプリケーションノート

著者

Rebecca Veeneman and Dale Snyder
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

要旨

サンプル前処理作業は非常に時間が掛かり、エラーが発生することもあるため、再現性や精度の低下につながることがあります。検量線の作成、サンプルの希釈、内部標準物質の添加、サンプルの誘導体化などの作業の多くは日常的に行う操作であるため、大量のリソースも必要になります。Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチでは、手動で行う作業よりも高い確度と精度で多くのサンプル前処理作業をこなすことができる上、使用する試薬の量も大幅に減らすことができ、オペレータが直接係わる時間も大幅に短縮できます。このことを確認するために、3 種類のサンプル前処理作業を Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチで実行できるよう調整したところ、確度と精度について手動メソッドと同等か、それ以上の結果を得ることができました。

Agilent Technologies

はじめに

Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチは、ガスクロマトグラフィ (GC) または液体クロマトグラフィ (LC) 分析用の多くのサンプル前処理作業を実行することができます。Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチは 2 つの液体分注モジュール、最高温度が 80 °C のバイアルヒータ、バイアルミキサ、およびバーコードリーダで構成されています (図 1)。これにより、希釈/取り分け、液体の添加、誘導体化や分解のための加熱、液液抽出、サンプルの混合が可能になります。バイアルラックは、個別に加熱/冷却することもできます。このサンプル前処理装置は、GC の上に設置した場合と同様に、オフラインでも Agilent 7693A 液体オートサンプラと同じ確度および精度で前処理作業を行うことができます [1]。いずれの分野でも、サンプルの希釈、検量線用標準試料の作成、サンプルの誘導体化など多くのサンプル前処理作業には時間が掛かり、多くのリソースを使用します。したがって、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチを使用してこれらの手順を自動化することは、多くの点で有効です。

図 1. Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチ

一般的なサンプル前処理アプリケーション 3 種類について手動メソッドと自動メソッドを比較したところ、自動化されたサンプル前処理によって高いデータ品質の結果が得られることが示されました。サンプル希釈、検量線用標準試料の調整、誘導体化を Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチで行い、良好な結果が得られました。

実験方法

Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチを使用して、3 種類の一般的なサンプル前処理作業を行いました。最初に、GC と LC の両方で分析を行うためにサンプル希釈と内部標準物質の添加を行いました。GC のサンプルでは、イソオクタンと、4 種類の化合物が含まれる標準溶液、それぞれ 50 µL を空の 2 mL オートサンプラバイアルに加えました。さらに、3 種類の化合物が含まれる内部標準溶液 (ISTD) 0.5 µL をバイアルに加えました。この溶液を内蔵のミキサを使用して混合した後、バイアルを GC に移して分析を行いました。LC のサンプルも同様の手順で行いました。空の 2 mL バイアルに、187.5 µL のアセトニトリル、62.5 µL の農薬スタンダード、125 µL の ISTD を加えました。このサンプルを混合した後、LC で分析を行いました。いずれのサンプル希釈も n=10 で行いました。

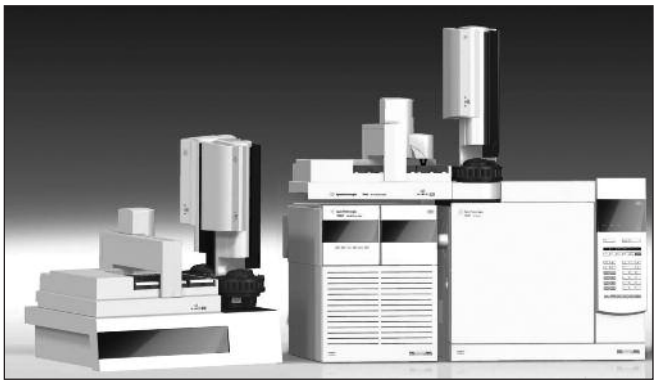

図 2. Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチとガスクロマトグラフおよび質量分析装置

次に、線形希釈による GC 検量線作成を 10 mL メスフラスコによる手動操作と、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチを使用してそれぞれ 3 回行いました。手動でスタンダードを作成するには、6 個の 10 mL メスフラスコに少量のヘキサンを加えました。セロロジカルピペットを使用して、5 種類の化合物が含まれる濃度 5 mg/mL 原液を 0.1～1 mL 加えました。ヘキサンを加えてフラスコで希釈し、50、100、200、300、400、および 500 ppm の濃度にしました。自動メソッドでは、100 µL のヘキサンを 6 本の空の 2 mL バイアルに加え、原液を 1～10 µL 加えて、手動と同じ濃度になるように調整しました。

図 3. Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチと液体クロマトグラフ

次に、シリル化反応により脂肪酸の誘導体化を行いました。手動による前処理では、自動ピペッタを使用して、100 µL のシリル化試薬を約 0.5 mL の遊離脂肪酸溶液に加えました。ヒータブロックを使用して溶液を 70 °C で加熱しました。Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチではバイアルヒータを使用して同様に誘導体化を行いました。

結果と考察

GC および LC 用サンプルの希釈

GC および LC 分析用に希釈した 10 個のサンプルについて、分注した溶媒、標準溶液、および ISTD の重量を測定し、分注操作の再現性を調べました。250 µL シリンジを使用して 50 µL を分注したところ、重量を測定した 10 個のサンプルの相対標準偏差 (RSD) は 0.5 % でした。ピーク面積から求めたサンプルの希釈誤差は 1 % 未満でした。ISTD はわずかに高い RSD を示しました。25 µL シリンジを使用して 0.5 µL を分注したところ、10 個のサンプルの RSD は 2 % でした。これよりも小さいシリンジを使用して ISTD を分注すると、RSD が下がり、溶媒と標準溶液を分注したときに得られる RSD に近づきました。加えた ISTD は、希釈したサンプルの確度には影響を与えませんでした (図 4)。

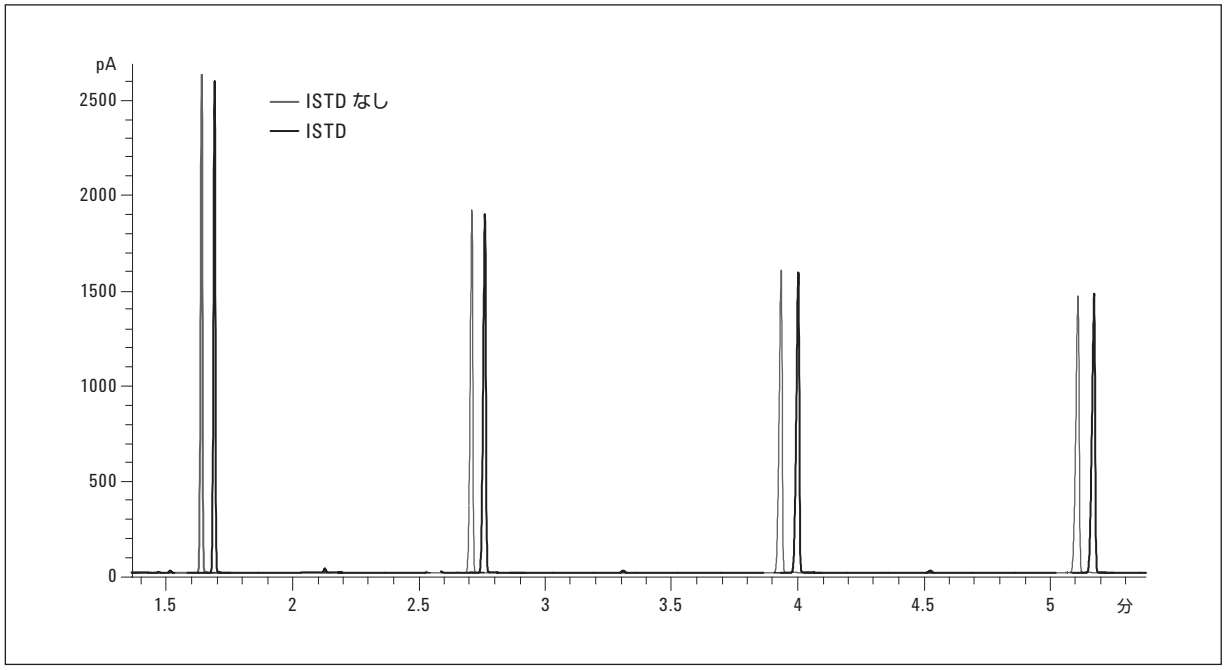

図 4. 標準溶液を希釈し、ISTD を添加したサンプルと添加しなかったサンプルの GC クロマトグラム (時間とずらして表示)。

LC 分析用に希釈した 10 個のサンプルについても同様の結果が得られました。3 種類の容積を 250 µL シリンジを使用して分注すると、RSD は重量で 0.5 % 未満となりました。分析後にピーク面積を確認したところ、 希釈誤差が 2 % 未満になっていることがわかりました (図 5)。

検量線用スタンダードの前処理

手動と Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチの両方でそれぞれスタンダードを 3 セット作成しました。同じグラフ上でそれぞれのスタンダードをプロットして比較したところ、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチの再現性が高いことがはっきりと示されました (図 6)。個々の検量線の R^2 値は 0.999 でしたが、すべての点を同時にプロットすると手動で前処理したスタンダードの R^2 値は 0.934 まで下がりました。これに対し、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチで前処理したサンプルの 3 つの検量線の個別の R^2 値は同じく 0.999 を示した上、すべて同時にプロットしても R^2 値は 0.997 となりました。

さらに、各スタンダードセットで相対感度係数 (RRF) を計算しました。RRF の RSD を計算すると、直線性と再現性の尺度が得られます。個々の検量線からは良好な RSD (5 % 未満) が得られ、線形関係を持つことがわかりました。ただし、3 つの検量線を同時に比較すると、7696 サンプル前処理ワークベンチで作成したスタンダードの方が優れていることは明白です。手動で作成した 3 本の検量線の RRF の平均 RSD は 16 %、7696 サンプル前処理ワークベンチで作成した 3 本の検量線の RRF の 平均 RSD は 4 % でした。

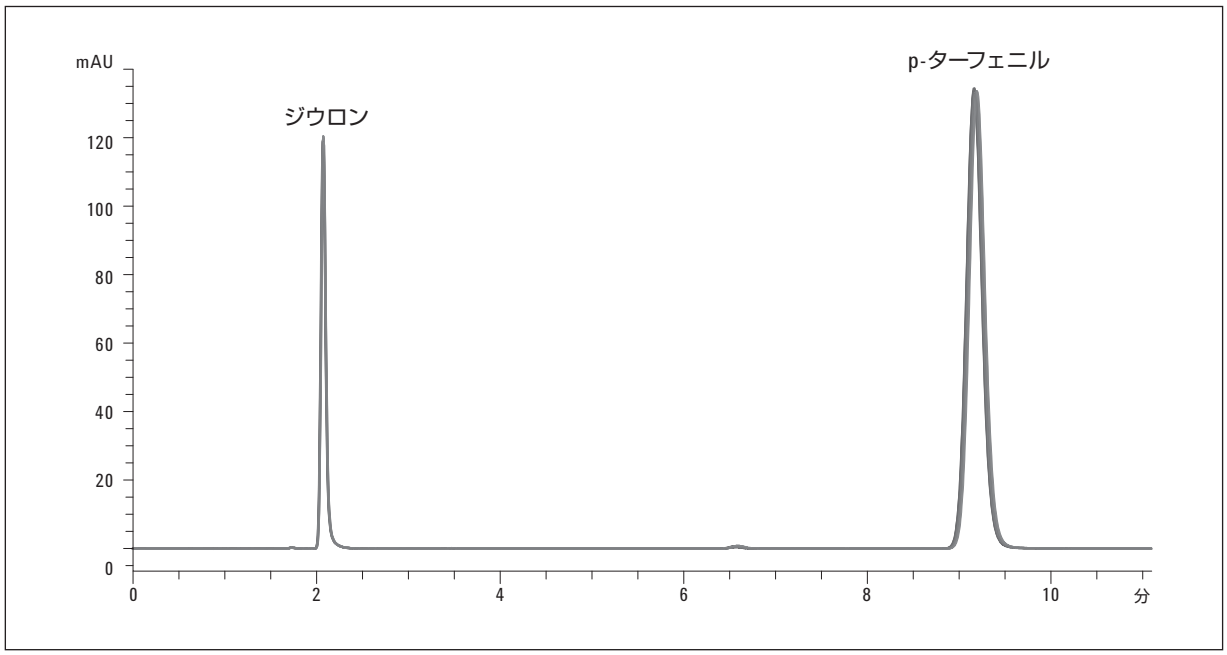

図 5. ISTD を加えて希釈した農薬スタンダードの LC クロマトグラム。ここに示す 5 種類のサンプルについて優れた再現性が観察されました。

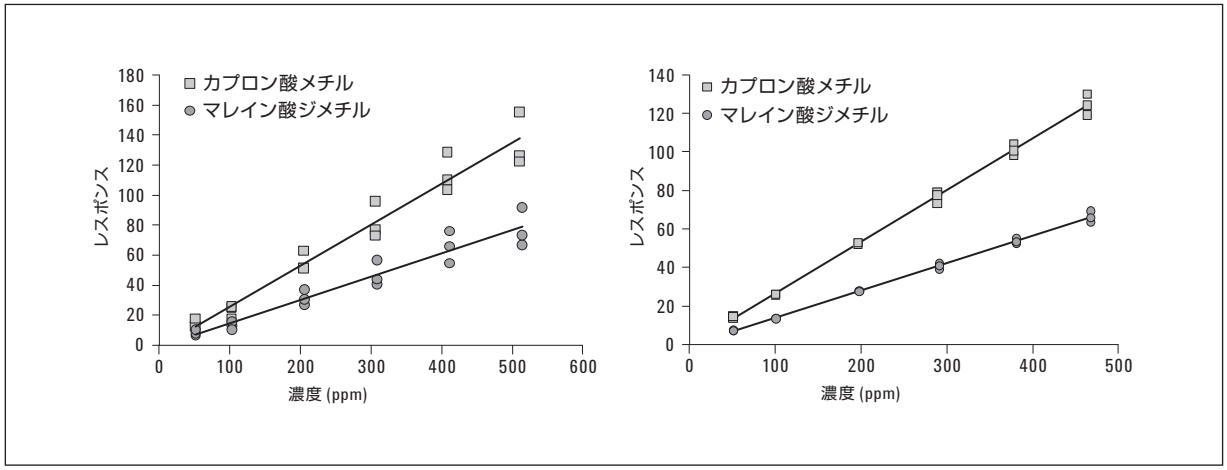

図 6. 2 種類の化合物の検量線。Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチを使用して前処理した右側の検量線は、手動で作成した検量線よりも再現性が明らかに優れています。

脂肪酸の誘導体化

サンプルの誘導体化については、誘導体化を手動で行った場合も、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチで行った場合も、同じ結果が得られました。4 種類の脂肪酸について、シリル化試薬を使用して誘導体化を行ったところ、いずれの方法でも違いは見られませんでした (表 1)。ただし、他のサンプル前処理例からわかるように、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチはその送液機能で高い再現性を示します。手動で前処理した 3 つのサンプルのピーク面積の RSD は 0.9 %、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチを使用して前処理した 3 つのサンプルの RSD は 0.7 % でした。

表 1. 脂肪酸のピーク面積をミリスチン酸についてノーマライズすると、誘導体化を自動化しても違いは見られませんでした。

対象化合物	比 (手動)	比 (自動)
カプリン酸	0.92	0.92
カプリン酸	1.2	1.2
ミリスチン酸	1.0	1.0
パルミチン酸	1.1	1.1

結論

このアプリケーションノートで示した 3 種類のサンプル前処理作業では、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチによる自動化で高い再現性が得られることがわかりました。サンプル希釈の確度と再現性は高く、検量線スタンダードは少ない誤差でより良好な直線性を示し、対象化合物による差もみられずサンプルの誘導体化を実行できました。ただし、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチを使用したサンプル前処理の自動化によって得られる利点はこれだけではありません。

検量線スタンダードの前処理を自動化することで、溶媒と試薬の使用量を大幅に削減できます。60 mL を超える溶媒を使用して 10 mL フラスコでスタンダードを作成する代わりに、使用した溶媒はわずか 600 µL でした (洗浄バイアルを除く)。この結果、ラボのコストを大幅に削減することができます。さらに、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチでは、手動でスタンダードを前処理した場合と比較して、検量線スタンダード作成に必要な時間が約半分になりました。他の自動化サンプル前処理作業に必要な時間は手動による方法と同じですが、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチにより、オペレータは実験計画やデータ解析など、他の作業に時間を割くことができるようになります。

結果として、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチを使用したサンプル前処理の自動化には多くの利点があります。他の作業に費やす時間を確保でき、溶媒の使用量を減らすことも重要ですが、このシステムでは、再現性と確度という大きな利点が得られます。自動化されたメソッドでは、再現性と確度が向上すると同時に誤差が小さくなり、その結果、データの品質が向上します。

参考資料

1. Susanne Moyer, Dale Synder, Rebecca Veeneman, and Bill Wilson, “Typical Injection Performance for the Agilent 7693A Autoinjector,” Agilent Technologies Publication 5990-4606EN.

詳細情報

アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2010
Printed in Japan
December 2, 2010
5990-6874JAJP

Agilent Technologies